

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2011年12月1日(01.12.2011)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2011/148996 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 5/07 (2010.01) C12M 1/42 (2006.01)  
C12M 1/00 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)  
C12M 1/34 (2006.01) H05H 1/54 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/062032
- (22) 国際出願日: 2011年5月25日(25.05.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2010-119524 2010年5月25日(25.05.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人熊本大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市黒髪二丁目39番1号 Kumamoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 王斗艶(WANG Douyan) [CN/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 関大亮(SEKI Daisuke) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 浪平隆男(NAMIHIRA Takao) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 齊藤壽仁(SAITO Hisato) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 秋山秀典(AKIYAMA Hidenori) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP).
- (74) 代理人: 松尾憲一郎(MATSUO Kenichiro); 〒8100042 福岡県福岡市中央区赤坂1丁目10番17号 しんくみ赤坂ビル7階 Fukuoka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

[続葉有]

(54) Title: LIQUID CULTURE MEDIUM FOR SUBSTANCE INTRODUCTION AND METHOD FOR INTRODUCING SUBSTANCE INTO CELL

(54) 発明の名称: 物質導入用液体培地及び細胞内への物質導入方法

[図1]

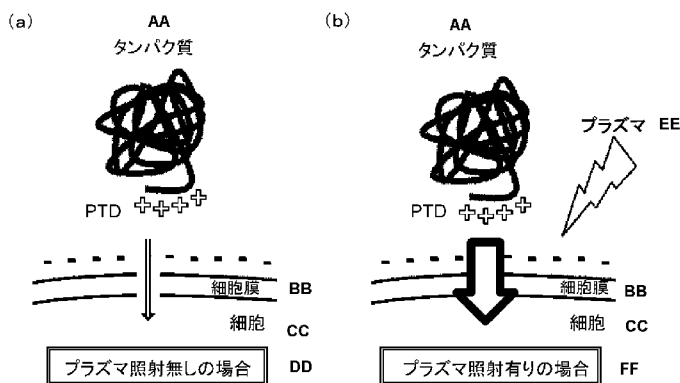


FIG. 1:  
AA PROTEIN  
BB CELL MEMBRANE  
CC CELL  
DD WITHOUT PLASMA IRRADIATION  
EE PLASMA  
FF WITH PLASMA IRRADIATION

(57) Abstract: Disclosed is a liquid culture medium for substance introduction, which is capable of increasing the survival rate of cells after substance introduction as much as possible when the cells are irradiated with plasma for the purpose of introducing a target substance into each of the cells. Specifically disclosed is a liquid culture medium for substance introduction, which is used for the purpose of introducing a predetermined target substance into a cell and enables introduction of the target substance into the cell by having the cell in the liquid culture medium, which contains the target substance, irradiated with a plasma jet. The liquid culture medium contains a damage preventing component that prevents the cell from damage due to the plasma jet.

(57) 要約: 細胞への標的物質導入を目的としたプラズマ照射に際し、物質導入後の細胞の生存率を可及的高めることのできる物質導入用液体培地を提供する。本発明に係る物質導入用液体培地によれば、所定の標的物質を細胞内に導

入させるための物質導入用液体培地であって、前記標的物質を含む液体培地中の前記細胞にプラズマジェットを照射して、前記標的物質を前記細胞内に導入可能とし、しかも、前記液体培地には、前記プラズマジェットに由来する前記細胞への障害を防止する障害防止成分が含有されていることとした。

WO 2011/148996 A1

(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 國際調查報告 (條約第 21 條(3))

## 明 細 書

### 発明の名称：物質導入用液体培地及び細胞内への物質導入方法 技術分野

[0001] 本発明は、物質導入用液体培地及び細胞内への物質導入方法に関する。

#### 背景技術

[0002] 従来、細胞内に導入したい物質（以下、標的物質という。）を含有する溶液を細胞に滴下し、この細胞に対して、プラズマ発生装置にて発生させたプラズマを照射することで、細胞内に所望の物質を導入する方法が提案されている（例えば、特許文献1参照。）。

[0003] この方法によれば、細胞内に標的物質を細胞内に存在させることができるとしている。

#### 先行技術文献

##### 特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開WO2002/064767号公報

#### 発明の概要

##### 発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、上記従来の物質の導入方法では、照射したプラズマによる細胞への障害が発生しやすく、プラズマ照射後（物質導入後）の細胞の生存率は、高いとは言い難いものであった。

[0006] 本発明は、斯かる事情に鑑みてなされたものであって、細胞への標的物質導入を目的としたプラズマ照射に際し、物質導入後の細胞の生存率を可及的高めることのできる物質導入用液体培地を提供する。また、本発明では、物質導入後の細胞の生存率を可及的高めることのできる細胞内への物質導入方法についても提供する。

##### 課題を解決するための手段

[0007] 上記従来の課題を解決するために、請求項1に係る本発明では、所定の標的物質を細胞内に導入させるための物質導入用液体培地であって、前記標的

物質を含む液体培地中の前記細胞にプラズマジェットを照射して、前記標的物質を前記細胞内に導入可能とし、しかも、前記液体培地には、前記プラズマジェットに由来する前記細胞への障害を防止する障害防止成分が含有されていることとした。

[0008] また、請求項 2 に係る本発明では、請求項 1 に記載の物質導入用液体培地において、前記障害防止成分は、200～300 nm の波長に吸光を示すタンパク質であることに特徴を有する。

[0009] また、請求項 3 に係る本発明では、請求項 1 に記載の物質導入用培地において、前記障害防止成分は、200～300 nm の波長に吸光を示す複数種類のタンパク質の混合物であることに特徴を有する。

[0010] また、請求項 4 に係る本発明では、請求項 3 に記載の物質導入用培地において、前記複数種類のタンパク質の混合物は、ウシ胎児血清であることに特徴を有する。

[0011] また、請求項 5 に係る本発明では、細胞内への物質導入方法において、所定の標的物質を含む請求項 1～4 に記載の物質導入用培地を収容した培養容器内の細胞にプラズマジェットを照射して、前記標的物質を前記細胞内に導入させることとした。

[0012] また、請求項 6 に係る本発明では、請求項 5 に記載の細胞内への物質導入方法において、前記プラズマジェットは、同プラズマジェットを出射するプラズマ照射装置によって照射されるものであり、前記プラズマ照射装置は、前記培養容器内の細胞を観察する観察部と、前記プラズマジェットを発生させるプラズマ発生部と、同プラズマ発生部を 3 次元方向に移動可能に支持するマイクロマニピュレータ部と、を備えることに特徴を有する。

[0013] また、請求項 7 に係る本発明では、請求項 6 に記載の細胞内への物質導入方法において、前記プラズマ発生部は、筒状の誘電体で構成すると共に、筒状内部に希ガスを主成分とするガス流を通気自在とした管体を形成し、該管体の外周面に一定間隔を保持して二極の電極を配設し、低周波高電圧電源から各電極に低周波高電圧を通電することにより、管体内部に放電を生起させ

て、管体の一端開口部からプラズマジェットを噴出させるように構成したことに特徴を有する。

[0014] また、請求項 8 に係る本発明では、請求項 5～7 に記載の細胞内への物質導入方法において、前記標的分子は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体から選ばれる少なくともいずれか 1 つであることに特徴を有する。

[0015] また、請求項 9 に係る本発明では、請求項 8 に記載の細胞内への物質導入方法において、前記ポリペプチド又は前記抗体には、細胞膜の透過を助長する膜透過シグナル配列が結合されていることに特徴を有する。

[0016] また、請求項 10 に係る本発明では、液体培地中で生育する細胞にプラズマジェットを照射して、前記液体培地中に含有させた所定の標的分子を前記細胞内に導入する際の、前記プラズマジェットに由来する前記細胞への障害防止成分として、ウシ胎児血清を使用することとした。

### 発明の効果

[0017] 請求項 1 に係る本発明によれば、所定の標的物質を細胞内に導入させるための物質導入用液体培地であって、前記標的物質を含む液体培地中の前記細胞にプラズマジェットを照射して、前記標的物質を前記細胞内に導入可能とし、しかも、前記液体培地には、前記プラズマジェットに由来する前記細胞への障害を防止する障害防止成分が含有されていることとしたため、細胞への標的物質導入を目的としたプラズマ照射に際し、物質導入後の細胞の生存率を可及的高めることのできる物質導入用液体培地を提供することができる。

[0018] また、請求項 2 に係る本発明によれば、前記障害防止成分は、200～300 nm の波長に吸光を示すタンパク質であることとしたため、プラズマジェットより放射される紫外線を吸光して、細胞に対する障害を抑制することができる。

[0019] また、請求項 3 に係る本発明によれば、前記障害防止成分は、200～300 nm の波長に吸光を示す複数種類のタンパク質の混合物であることとしたため、プラズマジェットより放射される紫外線を吸光して、細胞に対する

障害を抑制することができる。

- [0020] また、請求項 4 に係る本発明によれば、前記複数種類のタンパク質の混合物は、ウシ胎児血清であることとしたため、プラズマジェットより放射される紫外線を吸光して、細胞に対する障害を抑制しつつ、細胞の育成を助長することができる。
- [0021] また、請求項 5 に係る本発明によれば、所定の標的物質を含む請求項 1 ～ 4 に記載の物質導入用培地を収容した培養容器内の細胞にプラズマジェットを照射して、前記標的物質を前記細胞内に導入させることとしたため、物質導入後の細胞の生存率を可及的高めることのできる細胞内への物質導入方法を提供することができる。
- [0022] また、請求項 6 に係る本発明によれば、前記プラズマジェットは、同プラズマジェットを出射するプラズマ照射装置によって照射されるものであり、前記プラズマ照射装置は、前記培養容器内の細胞を観察する観察部と、前記プラズマジェットを発生させるプラズマ発生部と、同プラズマ発生部を 3 次元方向に移動可能に支持するマイクロマニピュレータ部と、を備えることとしたため、所定の細胞を確認しつつ、その細胞にピンポイントで所望の物質を導入することができる。
- [0023] また、請求項 7 に係る本発明によれば、前記プラズマ発生部は、筒状の誘電体で構成すると共に、筒状内部に希ガスを主成分とするガス流を通気自在とした管体を形成し、該管体の外周面に一定間隔を保持して二極の電極を配設し、低周波高電圧電源から各電極に低周波高電圧を通電することにより、管体内部に放電を生起させて、管体の一端開口部からプラズマジェットを噴出させるように構成したため、細径で非熱平衡の大気圧プラズマジェットを細胞に照射することができる。
- [0024] また、請求項 8 に係る本発明によれば、前記標的分子は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体から選ばれる少なくともいずれか 1 つであることとしたため、生きた細胞内に、ポリペプチドやポリヌクレオチド、抗体を存在させることができる。

[0025] また、請求項 9 に係る本発明によれば、前記ポリペプチド又は前記抗体には、細胞膜の透過を助長する膜透過シグナル配列が結合されていることとしたため、ポリペプチドや抗体を高効率で細胞内に導入することができる。

[0026] また、請求項 10 に係る本発明によれば、液体培地中で生育する細胞にプラズマジェットを照射して、前記液体培地中に含有させた所定の標的分子を前記細胞内に導入する際の、前記プラズマジェットに由来する前記細胞への障害防止成分としてウシ胎児血清を使用することとしたため、細胞への標的物質導入を目的としたプラズマ照射に際し、物質導入後の細胞の生存率を可及的高めつつ、細胞へ標的物質を導入することができる。

### 図面の簡単な説明

[0027] [図1]本実施形態に係るタンパク質の細胞への導入方法を示した概念図である。

[図2]細胞へ導入するためのタンパク質を発現させる発現ベクターを示した説明図である。

[図3]プラズマ発生装置の構成を示した説明図である。

[図4]電極部の構成を示した説明図である。

[図5]タンパク質の細胞への導入試験の結果を示す説明図である。

[図6]プラズマ照射装置の構成を示した説明図である。

[図7]変形例に係る電極部の構成を示した説明図である。

[図8]変形例に係る電極部の構成を示した説明図である。

### 発明を実施するための形態

[0028] 本発明は、所定の標的物質を細胞内に導入させるための物質導入用液体培地を提供するものである。

[0029] 特に、本実施形態に係る物質導入用液体培地では、前記標的物質を含む液体培地中の前記細胞にプラズマジェットを照射して、前記標的物質を前記細胞内に導入可能とし、しかも、前記液体培地には、前記プラズマジェットに由来する前記細胞への障害を防止する障害防止成分が含有されている点に特徴を有している。

- [0030] ここで標的物質は、特に限定されるものではなく、例えば、ポリペプチド（タンパク質）や、ポリヌクレオチド（核酸）や、抗体、有機化合物、無機化合物を対象とすることができる。
- [0031] また、標的物質を含有させるための液体培地は、少なくとも細胞を培養できる組成を有するものであれば特に限定されるものではない。すなわち、最少培地であっても、富栄養培地であっても良い。
- [0032] また、本明細書において細胞への障害とは、致死性であるか否かに拘わらず、プラズマジェットの照射による細胞への何らかのダメージを意味するものである。特に本実施形態に係る物質導入用液体培地は、プラズマジェットに由来する紫外線や活性酸素種などの障害因子によって細胞が障害されてしまうのを効果的に防止することができる。
- [0033] 障害防止成分は、200～300 nmの波長に吸光を示すタンパク質としても良い。このようなタンパク質は特に限定されるものではなく、水溶液の状態でも200～300 nmに吸光を示すようなタンパク質であれば良い。
- [0034] また、障害防止成分は、200～300 nmの波長に吸光を示す複数種類のタンパク質の混合物であっても良い。このような混合状態のタンパク質についても特に限定されるものではなく、個々のタンパク質のうちいずれか一部が200～300 nmの波長のうち一部分に吸光を示すタンパク質であっても、その他のタンパク質がその他の波長における吸光を補うものであれば良い。換言すれば、混合タンパク質全体として200～300 nmの波長に吸光を示せばよい。
- [0035] このような混合タンパク質としては、例えば、ウシ胎児血清（FBS:Fetal Bovine Serum）とすることができる。ウシ胎児血清を障害防止成分として用いることにより、細胞因子による細胞への障害を防止することができ、しかも、細胞の生育を助長することができる。
- [0036] 付言すれば、障害防止成分として添加されたウシ胎児血清により細胞に対して致死的なダメージの量や強度では無くなった障害因子であっても、細胞に対して若干の（非致死的な）ダメージを与える場合がある。しかしながら



、ウシ胎児血清を障害防止成分として用いることにより、細胞の生育を助長することができ、障害された細胞の回復を促進して、物質導入後の細胞の生存率をさらに高めることができる。

[0037] また、このような障害防止成分の培地中への添加量は、1～10%、より好ましくは5～10%とすることができる。1%を下回ると障害防止効果が期待できなくなり、10%を上回っても障害防止効果の向上は見込めなくなる。特に、障害防止成分を5～10%の範囲内とすることにより、十分な障害防止効果を期待することができ、また、物質導入後の細胞の生存率をさらに高めつつ、無駄のない添加を行うことができる。

[0038] また、本発明は、所定の標的物質を含んだ本実施形態に係る物質導入用培地を収容した培養容器内の細胞にプラズマジェットを照射して、標的物質を細胞内に導入させる細胞内への物質導入方法を提供するものでもある。

[0039] ここで、プラズマジェットは、同プラズマジェットを出射するプラズマ照射装置によって照射されるものとしても良い。

[0040] 特に、本実施形態に係る細胞内への物質導入方法にて使用するプラズマ照射装置は、培養容器内の細胞を観察する観察部と、プラズマジェットを発生させるプラズマ発生部と、同プラズマ発生部を3次元方向に移動可能に支持するマイクロマニピュレータ部と、を備えている点に特徴を有している。

[0041] この際、使用者は、培養容器内の細胞を観察しながらマイクロマニピュレータ部を操作することにより、プラズマ発生部より発生するプラズマジェットを所定の細胞にピンポイントで照射することができる。

[0042] したがって、所定の細胞に対し標的物質を細胞内へ効率的に導入することが可能となる。

[0043] また、プラズマ照射装置のプラズマ発生部は、筒状の誘電体で構成すると共に、筒状内部に希ガスを通気自在とした管体を形成し、該管体の外周面に電極を配設し、低周波高電圧電源から電極に低周波高電圧を通電することにより、管体内部に放電を生起させて、管体の一端開口部からプラズマジェットを噴出させるように構成している。

- [0044] ここで、管体を構成する誘電体としては、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリイミド等のプラスチック、ガラス、石英、二酸化珪素、酸化アルミニウム、酸化ジルコニウム、酸化チタン等の金属酸化物あるいはチタン酸バリウム等の複合金属酸化物等を挙げることが出来る。特に、誘電体にガラスを用いることにより、筒径を容易に調整することができる。
- [0045] また、希ガスを主成分とするガス流は、希ガスを含有していれば特に限定されるものではない。希ガスとしては、たとえばヘリウムやアルゴンを好適に使用することができる。この希ガスを主成分とするガス流は、その組成の全部が希ガスであっても良く、また、主成分を希ガスとして、その中へ他のガス種を少量混入していても良い。混入するガス種としては、例えば、酸素（0.1～10%）を挙げることができる。希ガス以外のガス種として酸素を混入させた場合には、酸素プラズマに起因する活性酸素等のフリーラジカルを発生させることができ、細菌等によりプラズマ照射中に培地が汚染されることを防止することができる。
- [0046] また、電極に印加する低周波高電圧は、たとえば周波数を1Hz～100MHzとすることができ、このときの電圧は1V～20kV程度とすることにより、希ガスを電離させてプラズマジェットを発生させることができる。
- [0047] このように電極に低周波高電圧を印加すると、管体の開口からプラズマジェットが噴出する。このとき、開口の形状や径は特に限定されるものではなく、プラズマジェットの照射領域の広さに応じて適宜決定することができるが、ごく狭い領域にプラズマジェットを照射する場合には、管体を開口へ向けて細径となるように形成するとよい。
- [0048] たとえば単一の細胞にピンポイントでプラズマジェットを照射したい場合には、開口の径を0.1 $\mu$ m～10 $\mu$ m程度に形成することで、極細のプラズマジェットを開口から噴出させることができる。
- [0049] また、上述のように構成したプラズマ照射装置は、細胞内に標的物質を導入する際に、効果的に使用することができる。

- [0050] 導入可能な物質としては、例えば、ポリペプチド（標的物質としてのタンパク質。以下、「標的タンパク質」ともいう。）、ポリヌクレオチド（核酸類）、抗体、生理活性物質、薬剤候補物質などあらゆる物質を対象とすることができる。
- [0051] 特に、導入する物質、すなわち標的物質を標的タンパク質や抗体とした場合には、細胞膜の透過を助長する膜透過シグナル配列が結合するのが好ましい。
- [0052] すなわち、標的タンパク質や抗体の導入に際して、タンパク質透過ドメイン（PTD：protein-transduction domain）を結合させた標的タンパク質や抗体を含む溶液中の細胞に、非熱平衡の大気圧プラズマジェットを照射して、前記標的タンパク質や抗体を細胞内に導入することで、非常に効率よく細胞内に標的タンパク質や抗体を存在させることができる。
- [0053] ここで、タンパク質透過ドメインは、標的タンパク質や抗体の細胞膜透過性を向上させる機能を有するものであれば特に限定されるものではなく、たとえば、HIV-TAT (YGRKKRRQRR) や ANTP (RQIKIKWPQNRRMKWKK) を用いることができる。なお、括弧内は各タンパク質透過ドメインのアミノ酸配列を示している。また、これらのタンパク質透過ドメインは、細胞内に導入する所定のタンパク質のN末端あるいはC末端側に連結するのが好ましいが、タンパク質の種類によってはN末端あるいはC末端以外の部分に付加することも可能である。細胞内に導入するタンパク質を構成するアミノ酸側鎖（例えば、システインのSH基等）に架橋剤などを用いて化学的に結合させても良い。
- [0054] なお、PTDを付加した標的タンパク質や抗体が細胞内に取り込まれやすくなることは既に知られているが、それでも効率的な取り込みとは言い難いものである。
- [0055] 例えば、プラズマを併用せずにPTDを付加した標的タンパク質を取り込む場合、図1（a）に示すように、正に帯電した標的タンパク質のPTDと、負に帯電した細胞膜とが引き合う力で行われるため非常に効率が悪い。
- [0056] 一方、図1（b）に示すように、プラズマジェットの照射を併用すると、

プラズマジェットに含まれる電子が細胞膜に付着することで、細胞膜に瞬間的に穿孔が生じ、PTDと細胞膜とが引き合うことで細胞周辺に集合した標的タンパク質が、細胞膜を容易に通り抜けることとなるため、導入効率が飛躍的に向上する。

[0057] また、細胞に照射するプラズマジェットの密度は特に限定されるものではなく、細胞の生存に障害を与えるほど過剰にならない限り良い。

[0058] 以下、本実施形態に係る物質導入用液体培地及び細胞内への物質導入方法について、プラズマ照射装置の構成にも言及しつつ、図面を参照しながら説明する。

[0059] [ベクターの調製]

あらかじめ入手した11R（アルギニン11個の繰り返し配列）からなるPTDをコードしたDNA断片（33bp）と、緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein:GFP）遺伝子とを、発現ベクターのマルチクローニングサイトに挿入した（図2参照。）。発現ベクターはpET30（Novagen）を用いた。構築したベクター（pET30-PTD-GFP）は、クローニングし、塩基配列の決定を行うことにより目的の位置にPTDをコードするDNA断片とGFP遺伝子とが挿入されたことが確認された。

[0060] [形質転換および発現]

次に、宿主としての大腸菌BL21（DE3）株に、調製した発現ベクターを、カルシウム法により導入して形質転換し、LB（Luria-Bertani）培地にて18時間培養を行った。

[0061] 培養した宿主としての大腸菌を13,000×gで3分間遠心分離することにより回収し、適宜洗浄操作を行った後に、生理食塩水中で超音波処理して宿主抽出液を得た。この宿主抽出液を粗酵素液として、以下に述べる細胞へのタンパク質導入実験に使用した。

[0062] [細胞への標的タンパク質導入実験]

次に得られたPTD連結GFPの細胞内への導入を行った。なお説明の便宜上、まずここでは照射するプラズマジェットを出射するプラズマ発生装置の構造

について述べ、その後、標的タンパク質の導入実験の詳細について述べる。

[0063] (プラズマ発生装置の構造)

図3に示すように、本実験にて使用したプラズマ発生装置Aは、プラズマを発生させる電極部10と、この電極部にヘリウムガスを供給するヘリウムガス供給部11と、電極部に低周波高電圧を供給する低周波高電圧電源部12とで構成している。

そして、電極部10にヘリウムガス供給部11よりヘリウムガスを供給するとともに、低周波高電圧電源部12より低周波高電圧を印加して、プラズマジェット18を生成し、培養容器26内の細胞17に照射可能としている。

[0064] 電極部10は、図4にも示すように、ガラスにて形成される先細状の管体13と、同管体13の外周面に一定間隔を保持して配設した第1及び第2の電極14, 15とで構成している。

[0065] 管体13は、一端をヘリウムガス供給部11に接続しており、ヘリウムガス供給部11より供給されるヘリウムガスが管体13内部を通気可能に構成している。

[0066] また、管体13の他端側は、先細状とした先端部に開口16を形成しており、管体13内部を通気するヘリウムガスが、同開口16より噴出するよう構成している。なお、このような先端先細状の管体13は、ガラス管の一部を周方向に熱し、赤熱した状態で引っ張ることにより形成することができる。この際、細径となったガラス管の切断位置を変えることにより、所望の開口径の管体13を作成することができる。

[0067] 第1電極14は、管体13の開口16近傍に同軸状に設けられた電極であり、低周波高電圧電源部12に電氣的に接続されている。また、第2電極15も管体13に同軸状に設けられた電極であるが、第1電極14に比して開口から遠位に配設されており、グラウンド接続されている。

[0068] すなわち、管体13内部を通気するヘリウムガスの上流側にグラウンド電極としての第2電極15を配設するとともに、下流側に低周波高電圧電極と

しての第1電極14を配設している。

[0069] そして、管体13内部にヘリウムガスを通気させるとともに、第1及び第2電極14、15間に低周波高電圧を印加することにより、開口16の先端からプラズマジェット18が噴出されるよう構成している。

[0070] (細胞へのタンパク質導入)

D-MEM+5%FBS培地中で3日間培養したHeLa細胞に、前述のPTD連結GFP又はPTDを連結していないGFPを導入する試験を行った。ここでは、比較対照のため、本実施形態に係る物質導入用液体培地を用いたサンプル1、比較用のサンプル2及び本実施形態に係る物質導入用液体培地を用いたサンプル3の3つのサンプルを調製し、それぞれに対して試験を試みた。調製したサンプルは以下の通りである。

[0071] 試験サンプル1：HeLa細胞が培養された培養容器内の培地を除き、本実施形態に係る物質導入用液体培地100 $\mu$ lを添加して調製した。この本実施形態に係る物質導入用液体培地は、標的物質としてPTD連結GFPを100 $\mu$ g/m $l$ 含有し、障害防止成分としてのウシ胎児血清(Fetal bovine serum; FBS)を5%含有するD-MEM (pH8.0)である。

[0072] 試験サンプル2：HeLa細胞が培養された培養容器内の培地を除き、PTD連結GFPを100 $\mu$ g/m $l$ 含有し、ウシ胎児血清を含有しないD-MEM (pH8.0)を100 $\mu$ l添加した。

[0073] 試験サンプル3：HeLa細胞が培養された培養容器内の培地を除き、PTDを連結していないGFPを100 $\mu$ g/m $l$ 含有し、ウシ胎児血清を5%含有するD-MEM (pH8.0)を100 $\mu$ l添加した。

[0074] ついで、これらの各サンプルに、前述のプラズマ発生装置Aにて発生させたプラズマジェットを30秒間照射して、試験後の細胞死の割合を検討した。なお、プラズマジェットの照射に際しては、電極部10には、ヘリウムガスを3.0l/minで供給するとともに、10kHzで10kVの低周波高電圧を印加してプラズマを発生させた。

[0075] その結果、障害防止成分を含有するサンプル1及びサンプル3におけるプ

ラズマジェット照射後の生細胞数は、照射前の細胞数に比して約24～29%の減少が見られた。

[0076] 一方、障害防止成分を含有しないサンプル2におけるプラズマジェット照射後の生細胞数は、照射前の細胞数に比して約56%減と相当数の細胞死が確認された。

[0077] これらの現象は、プラズマジェットの照射により、緩衝液中に何らかの活性酸素種や紫外線が発生し、細胞を障害しているものと思われる。すなわち、障害防止成分（ここでは、FBS）は、これら活性酸素種や紫外線から細胞を守る役割を果たしていると考えられる。

[0078] したがって、細胞を障害防止成分存在下でプラズマジェット照射することにより、細胞が液中に存在する場合であっても、活性酸素種による障害を防止しながら、標的物質の導入を行うことができる。

[0079] 次に、プラズマジェットを照射したサンプル1及びサンプル3の細胞の検鏡結果を図5に示す。その結果、サンプル3では、細胞核染色において確認された細胞の位置（写真右上）で、GFPによる蛍光は検出されなかった（写真左上）。一方、サンプル1では、細胞核染色において確認された細胞の位置（写真右下）で、GFPによる蛍光が確認された（写真左下）。

[0080] このことから、細胞への標的物質（ここでは、標的タンパク質）導入を目的としたプラズマ照射に際し、障害防止成分を含有させたことにより、物質導入後の細胞の生存率の向上を図ることが可能であることが示された。また、プラズマジェットの照射により、PTDを付加したタンパク質が効率よく細胞内に取り込まれることが示された。

[0081] 次に、タンパク質の導入量をより正確に確認すべく、細胞内に導入されたPTD結合GFP（又はGFP）の発光量をフローサイトメトリーにて測定することで比較した。

[0082] その結果、PTD連結GFPを用いてプラズマジェットの照射を行ったサンプル1の細胞は、プラズマジェットの照射を行わなかったサンプル1の細胞に比して、約1.5倍のPTD連結GFPが導入されたことが示された。また、PTD連結

GFPを用いてプラズマジェットの照射を行ったサンプル1の細胞は、GFPを用いてプラズマジェットの照射を行ったサンプル3の細胞に比して、約1.2倍のタンパク質が導入されたことが示された。

[0083] 上述してきたように、本実施形態に係る物質導入用液体培地によれば、細胞への標的物質導入を目的としたプラズマ照射に際し、物質導入後の細胞の生存率を可及的高めることができる。また、本実施形態に係る細胞内への物質導入方法によれば、物質導入後の細胞の生存率を可及的高めることができる。また、上述のプラズマ照射装置を採用することにより、細胞内へ目的とするタンパク質を効率よく導入することができる。

[0084] [プラズマ照射装置の変形例]

次に、変形例に係るプラズマ照射装置Bについて図6を参照しながら説明する。

[0085] 図6に示すように、変形例に係るプラズマ照射装置Bは、培養容器26内の細胞17を観察する観察部としての顕微鏡部と、プラズマジェット18を発生させるプラズマ発生部と、同プラズマ発生部を3次元方向に移動可能に支持するマイクロマニピュレータ部と、制御部34とが備えられている。

[0086] 顕微鏡部は、検鏡対象に光を照射する照明部20と、同照明部20から出射する光量の調整を行う照明制御部21と、検鏡対象となる細胞17が収容された培養容器26を載置するステージ部22と、同ステージ部22を上下、左右、前後方向に移動させるステージ駆動部23と、検鏡対象からの光を入射させる対物光学部24と、対物光学部24より出射された光を使用者の目に入射させる接眼光学部25とを備えている。

[0087] 照明部20は、検鏡対象を照明する光を出射するものであり、例えば、白色光を出射する光源を内蔵している。また、この照明部20は、必要に応じて、所定の物質を励起させる励起光を出射する光源を内蔵しても良い。

[0088] また、照明部20は、照明制御部21に電氣的に接続されており、同照明制御部21の制御により、光源から出射される光量や、光源の種類を変更可能に構成している。



- [0089] ステージ部 22 は、培養した細胞が定着したシャーレ等の培養容器 26 が載置される部位である。ステージ部 22 の略中央には、検鏡対象から出射された光を対物光学部 24 へ導くための透孔（図示せず）が穿設されており、この透孔を通して細胞やプラズマジェット 18 が視認される。
- [0090] また、ステージ部 22 は、ステージ駆動部 23 に電氣的に接続されており、図示しないステージ移動機構により上下、左右、前後方向に移動可能に構成している。
- [0091] 対物光学部 24 は、拡大倍率の異なる複数の対物レンズ 27, 27 と、同対物レンズ 27, 27 の位置合わせを行う円盤状の対物レンズ回転台 28 と、所定の対物レンズ 27 に入射した光を接眼光学部 25 へ導くミラー 29 とを備えている。なお、ミラー 29 は、波長選択性を有するようにしても良い。例えば、可視光は反射するが、プラズマジェット 18 から放射される紫外線を反射せず、接眼光学部 25 に光を導かないように構成しても良い。このような構成とすることにより、プラズマジェットから放射される紫外線が使用者の目に障害を与えることを防止することができる。
- [0092] また、接眼光学部 25 は、対物光学部 24 より出射された光をレンズ等により屈折させて所定の射出瞳で出射し、検鏡対象の像を使用者の網膜上に所定の倍率で結像させる。
- [0093] このように、顕微鏡部は、培養容器内の細胞を観察可能に構成している。
- [0094] プラズマ発生部は、前述の電極部 10 と、低周波高電圧供給部 30 と、ヘリウムガス供給部 31 とで構成している。なお、プラズマ発生部の構成については、図 3 及び図 4 を用いて説明した構成と略同様であるため、説明を省略する。
- [0095] マイクロマニピュレータ部は、電極部 10 を移動自在に支持するアーム部 32 と、同アーム部 32 を駆動させるマニピュレータ駆動部 33 とで構成している。
- [0096] アーム部 32 は、マニピュレータ駆動部 33 からの駆動信号に応じて駆動し、アーム部 32 に支持した電極部 10 を 3 次元方向に精度良く移動させる

。

[0097] また、前述の照明制御部 21 と、低周波高電圧供給部 30 と、ヘリウムガス供給部 31 と、マニピュレータ駆動部 33 と、ステージ駆動部 23 とは、制御部 34 に電氣的に接続されている。

[0098] この制御部 34 には、さらに、使用者からの動作指示を受け付ける操作部 35 が接続されており、制御部 34 に接続された各機器類が、使用者の操作入力に応じて動作するよう構成している。

[0099] このような構成を有するプラズマ照射装置 B によれば、所定の細胞を確認しつつ、その細胞にピンポイントで所望の物質を導入することができる。

[0100] (電極部の変形例 1)

次に、電極部の変形例について図 7 を参照しながら説明する。図 7 に示す電極部 40 は、先に説明した電極部 10 と略同様の構成を有しているが、管体 13 の外側に吸引管 41 を配設し二重管状としている点で構造を異にしている。なお、以下の説明において、前述の電極部 10 と同様の構成については、同じ符号を付して説明を省略する。

[0101] 具体的には、管体 13 の外周面と吸引管 41 の内周面との間に吸引管路 42 を形成し、この吸引管路 42 を吸引装置 43 に接続して、開口 16 から過剰に拡散するヘリウムガスを吸引可能に構成している。また、各電極 14, 15 及び管体 13 の外周面には絶縁被覆体 44 を設けており、各電極 14, 15 と吸引管 41 との間の絶縁破壊を防ぐようにしている。なお、この絶縁被覆体 44 は、例えば、絶縁性を有する熱収縮チューブ等を好適に用いることができる。

[0102] このような構成とすることにより、余分なヘリウムガスを拡散させることがないため、開口 16 から噴出する希ガスが細胞へ余分に当たらないようにすることができる。

[0103] (電極部の変形例 2)

次に、電極部の更なる変形例について図 8 を参照しながら説明する。図 8 に示す電極部 50 は、先に説明した電極部 40 と略同様の構成を有している

が、管体 13 に配設した電極が第 1 電極 14 のみである点に特徴を有している。

[0104] このような構成とした場合、第 1 電極 14 の上流方向へも、ヘリウムガスの流れに逆らってプラズマジェットが伸長することとなるが、開口 16 の先端からもプラズマジェット 18 を噴出させることができる。

[0105] 上述してきたように、本実施形態に係る物質導入用液体培地によれば、所定の標的物質を細胞内に導入させるための物質導入用液体培地であって、前記標的物質を含む液体培地中の前記細胞にプラズマジェットを照射して、前記標的物質を前記細胞内に導入可能とし、しかも、前記液体培地には、前記プラズマジェットに由来する前記細胞への障害を防止する障害防止成分が含有されていることとしたため、細胞への標的物質導入を目的としたプラズマ照射に際し、物質導入後の細胞の生存率を可及的高めることができる。

[0106] また、本実施形態に係る細胞内への物質導入方法によれば、所定の標的物質を含む請求項 1～4 に記載の物質導入用培地を収容した培養容器内の細胞にプラズマジェットを照射して、前記標的物質を前記細胞内に導入させることとしたため、物質導入後の細胞の生存率を可及的高めることができる。

[0107] また、プラズマ照射装置 B を採用することにより、培養容器 26 内の細胞 17 にプラズマジェット 18 を照射するプラズマ照射装置 B であって、培養容器 26 内の細胞 17 を観察する観察部（顕微鏡部）と、プラズマジェット 18 を発生させるプラズマ発生部と、同プラズマ発生部を 3 次元方向に移動可能に支持するマイクロマニピュレータ部と、を備えたことにより、所定の細胞を確認しつつ、その細胞にピンポイントで所望の物質を導入することができる。

[0108] また、タンパク質透過ドメイン (PTD) を有するタンパク質を含有させた溶液中の細胞 17 に、非熱平衡の大気圧プラズマジェット 18 を照射して、タンパク質を細胞 17 内に導入することにより、タンパク質の細胞内への導入効率を飛躍的に向上させることができる。

[0109] 最後に、上述した各実施の形態の説明は本発明の一例であり、本発明は上

述の実施の形態に限定されることはない。このため、上述した各実施の形態以外であっても、本発明に係る技術的思想を逸脱しない範囲であれば、設計等に応じて種々の変更が可能であることは勿論である。

[0110] 例えば、前述の実施例においてプラズマ照射装置は、観察部の一例として顕微鏡部を備えることとしたが、使用者が細胞を目視確認できる構成を有していればこれに限定されるものではない。

[0111] また、プラズマ照射装置の一例として、顕微鏡部とプラズマ発生部とマイクロマニピュレータ部とを備えたプラズマ照射装置により行う例を示したが、これに限定されるものではない。

[0112] 例えば、ヒトの体内に挿入可能なカテーテル形状とし、その先端に前述の電極部を装着することにより、ヒトの体内の細胞に所定の物質を導入するよう構成しても良い。このような構成とすることにより、いままで治療が困難であった生体深部の患部にも直接的な治療を行うことができる。

### 符号の説明

- [0113]
- 10 電極部
  - 11 ヘリウムガス供給部
  - 12 低周波高電圧電源部
  - 13 管体
  - 14 第1電極
  - 15 第2電極
  - 16 開口
  - 17 細胞
  - 18 プラズマジェット
  - 24 対物光学部
  - 25 接眼光学部
  - 26 培養容器
  - 27 対物レンズ
  - 33 マニピュレータ駆動部

3 4 制御部

A プラズマ発生装置

B プラズマ照射装置

## 請求の範囲

- [請求項1] 所定の標的物質を細胞内に導入させるための物質導入用液体培地であって、
- 前記標的物質を含む液体培地中の前記細胞にプラズマジェットを照射して、前記標的物質を前記細胞内に導入可能とし、しかも、前記液体培地には、前記プラズマジェットに由来する前記細胞への障害を防止する障害防止成分が含有されていることを特徴とする物質導入用液体培地。
- [請求項2] 前記障害防止成分は、200～300nmの波長に吸光を示すタンパク質であることを特徴とする請求項1に記載の物質導入用液体培地。
- [請求項3] 前記障害防止成分は、200～300nmの波長に吸光を示す複数種類のタンパク質の混合物であることを特徴とする請求項1に記載の物質導入用培地。
- [請求項4] 前記複数種類のタンパク質の混合物は、ウシ胎児血清であることを特徴とする請求項3に記載の物質導入用培地。
- [請求項5] 所定の標的物質を含む請求項1～4に記載の物質導入用培地を収容した培養容器内の細胞にプラズマジェットを照射して、前記標的物質を前記細胞内に導入させる細胞内への物質導入方法。
- [請求項6] 前記プラズマジェットは、同プラズマジェットを出射するプラズマ照射装置によって照射されるものであり、
- 前記プラズマ照射装置は、
- 前記培養容器内の細胞を観察する観察部と、
- 前記プラズマジェットを発生させるプラズマ発生部と、
- 同プラズマ発生部を3次元方向に移動可能に支持するマイクロマニピュレータ部と、を備えることを特徴とする請求項5に記載の細胞内への物質導入方法。
- [請求項7] 前記プラズマ発生部は、筒状の誘電体で構成すると共に、筒状内部

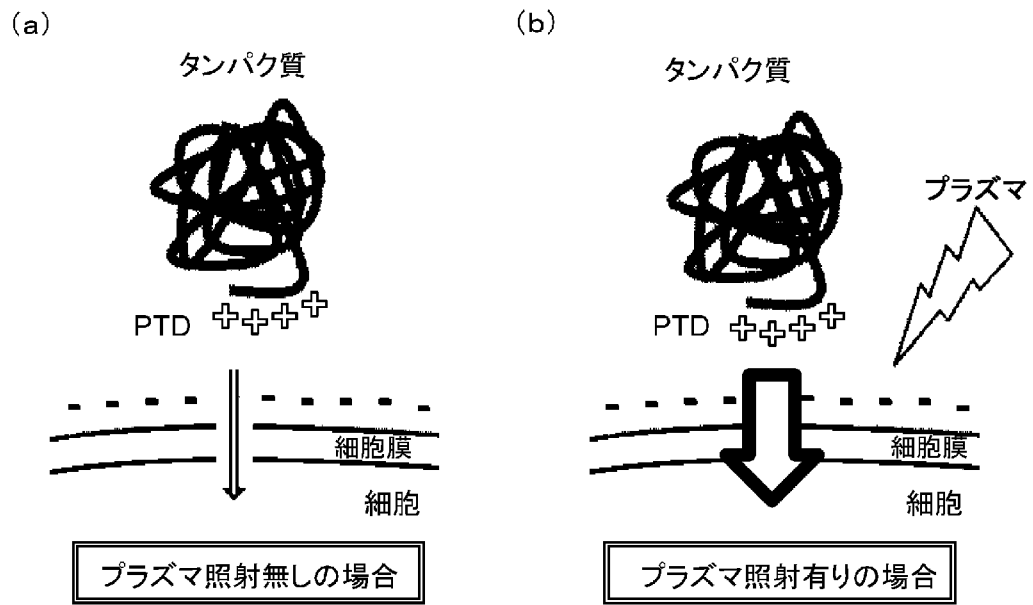
に希ガスを主成分とするガス流を通気自在とした管体を形成し、該管体の外周面に一定間隔を保持して二極の電極を配設し、低周波高電圧電源から各電極に低周波高電圧を通電することにより、管体内部に放電を生起させて、管体の一端開口部からプラズマジェットを噴出させるように構成したことを特徴とする請求項6に記載の細胞内への物質導入方法。

[請求項8] 前記標的分子は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体から選ばれる少なくともいずれか1つであることを特徴とする請求項5～7に記載の細胞内への物質導入方法。

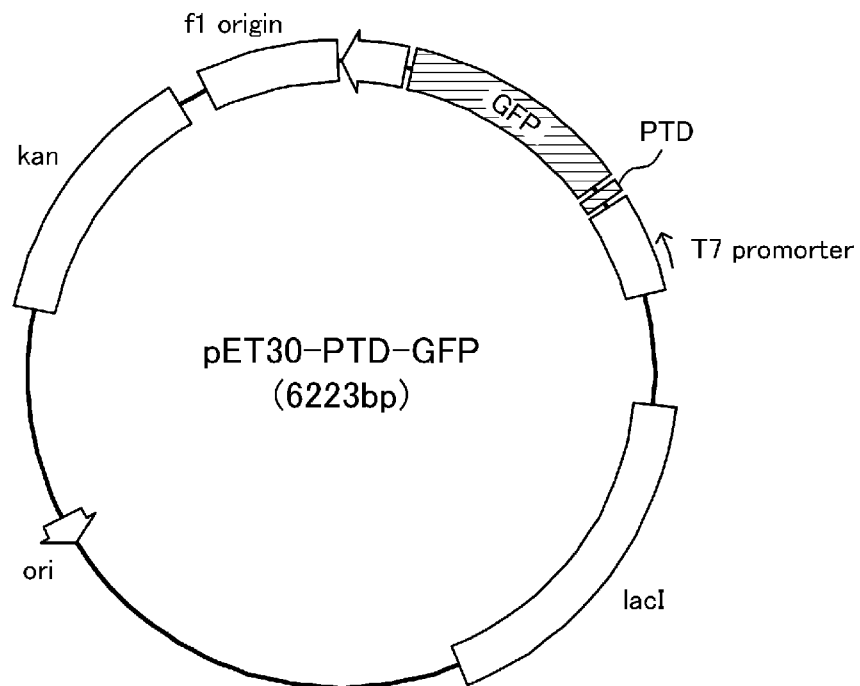
[請求項9] 前記ポリペプチド又は前記抗体には、細胞膜の透過を助長する膜透過シグナル配列が結合されていることを特徴とする請求項8に記載の細胞内への物質導入方法。

[請求項10] 液体培地中で生育する細胞にプラズマジェットを照射して、前記液体培地中に含有させた所定の標的分子を前記細胞内に導入する際の、前記プラズマジェットに由来する前記細胞への障害防止成分としてのウシ胎児血清の使用。

[図1]

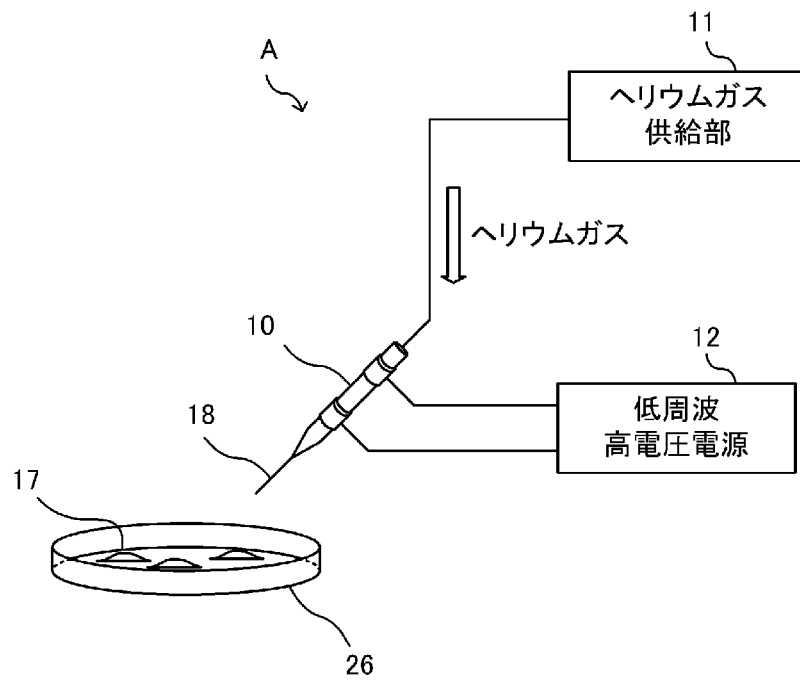


[図2]

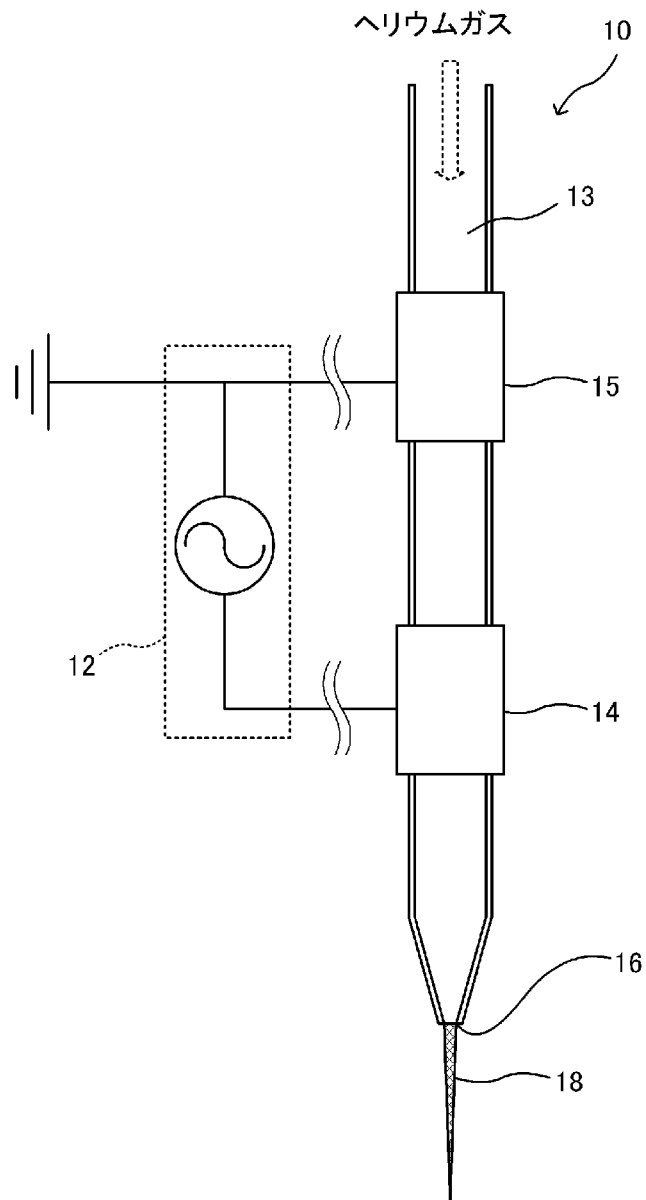




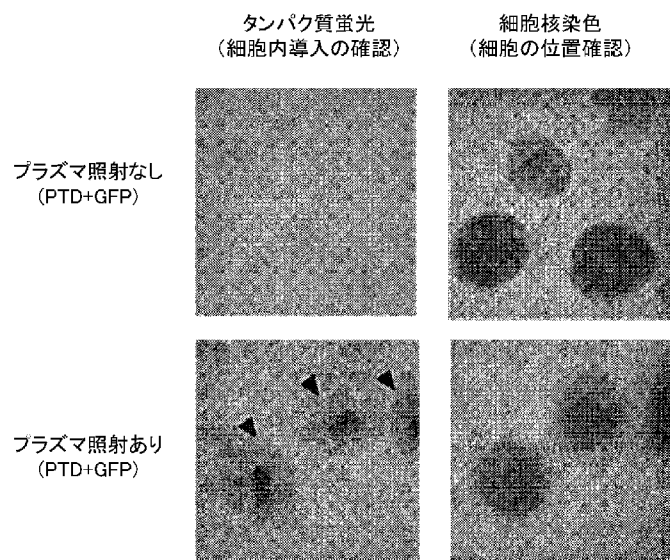
[図3]



[図4]

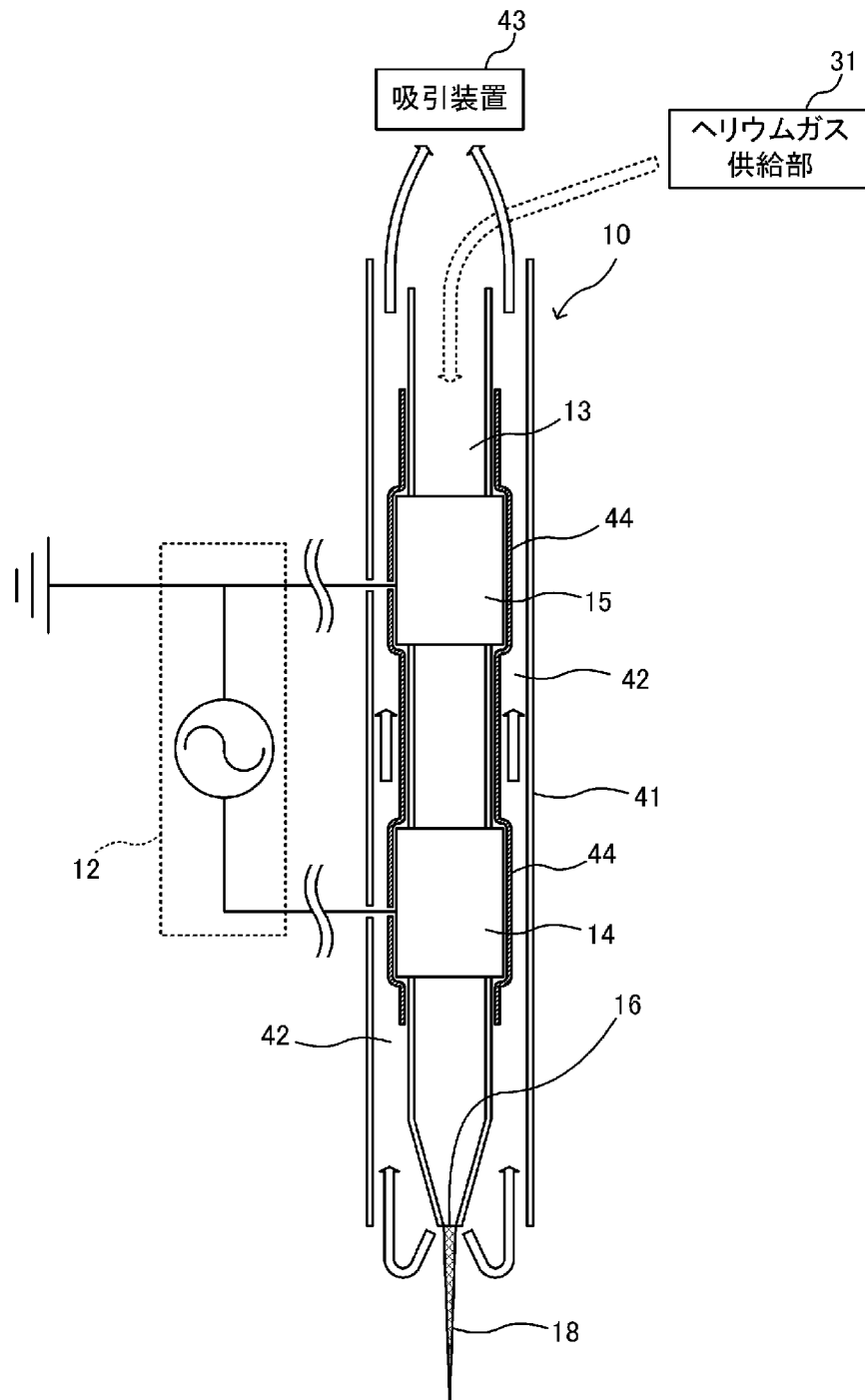


[図5]

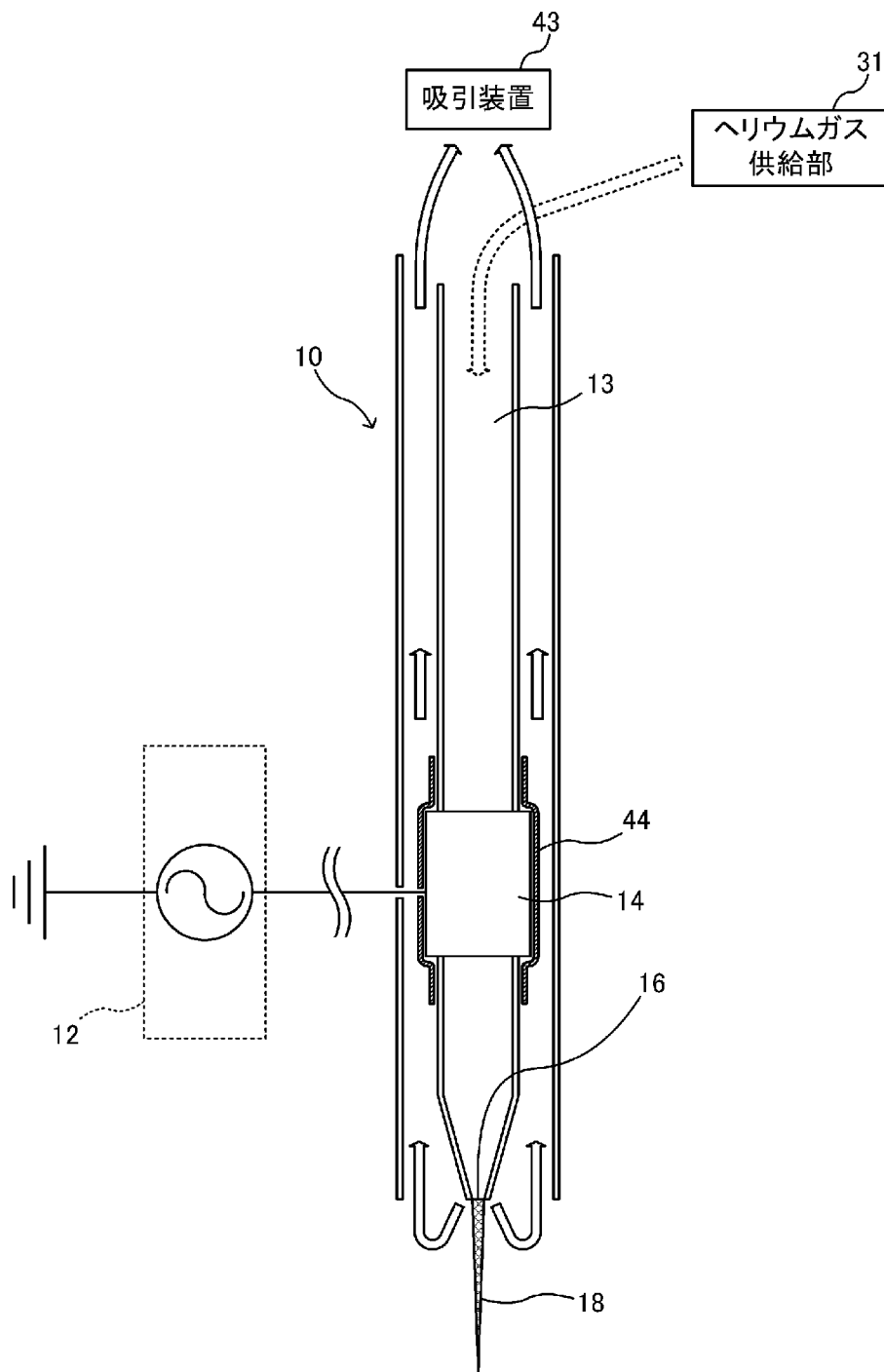




[図7]



[図8]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/062032

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/07(2010.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12M1/42(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, H05H1/54(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/07, C12M1/00, C12M1/34, C12M1/42, C12N5/071, H05H1/54

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII), PubMed

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	LEDUC, M., et al., "Cell permeabilization using a non-thermal plasma", New J. Phys., 2009, 11, 1-12, 115021	1-8, 10/9
Y/A	JP 2004-512275 A (Aventis Pharmaceuticals Inc.), 22 April 2004 (22.04.2004), claims 1 to 21 & US 2003/0229202 A1 & EP 1360311 A2 & WO 2002/018572 A2	9/1-8, 10
Y/A	JP 2006-219435 A (Osaka University), 24 August 2006 (24.08.2006), claims 1 to 7 & EP 1849798 A1 & WO 2006/085583 A	9/1-8, 10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
23 June, 2011 (23.06.11)

Date of mailing of the international search report  
05 July, 2011 (05.07.11)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2011/062032

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2002/064767 A1 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 22 August 2002 (22.08.2002), claims 1 to 6; example 4 & US 2004/0110297 A1 & EP 1365021 A1	1-10
A	WO 2004/015101 A1 (Astellas Pharma Inc.), 19 February 2004 (19.02.2004), claims 1 to 35; example 4 (Family: none)	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/07(2010.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12M1/42(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, H05H1/54(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/07, C12M1/00, C12M1/34, C12M1/42, C12N5/071, H05H1/54

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	LEDUC, M., et al., "Cell permeabilization using a non-thermal plasma", New J. Phys., 2009, 11, 1-12, 115021	1-8, 10/9
Y/A	JP 2004-512275 A (アベンティス・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド) 2004.04.22, 【請求項1】 - 【請求項21】 & US 2003/0229202 A1 & EP 1360311 A2 & WO 2002/018572 A2	9/1-8, 10
Y/A	JP 2006-219435 A (国立大学法人大阪大学) 2006.08.24, 【請求項1】 - 【請求項7】 & EP 1849798 A1 & WO 2006/085583 A	9/1-8, 10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23.06.2011

国際調査報告の発送日

05.07.2011

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

神谷 昌男

4B

4503

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2002/064767 A1 (藤沢薬品工業株式会社) 2002.08.22, 【請求項1】 - 【請求項6】、実施例4 & US 2004/0110297 A1 & EP 1365021 A1	1-10
A	WO 2004/015101 A1 (アステラス製薬株式会社) 2004.02.19, 【請求項1】 - 【請求項35】、実施例4 (ファミリーなし)	1-10